ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ЛАБОРАТОРНЫЙ СОВЕТ ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Ускоренные методы выявления санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов с использованием подложек «RIDA®COUNT», производства Chisso Corporation, Япония

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

№ 02.011-06

Издание официальное

Москва
2006

gost.e-ecolog.ru

Ускоренные методы выявления санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов с использованием подложек «RIDA®COUNT», производства Chisso Corporation, Япония

Методические рекомендации
№ 02.011-06

Ускоренные методы выявления санитарно- показательных и патогенных микроорганизмов с использованием подложек «RIDA®COUNT», производства Chisso Corporation, Япония: Методические рекомендации. — М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, 2006.— 10 с.

1. Разработаны: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (Н.С. Кривопалова, О. К. Белобородова, О.Д. Гончарук, М.А. Черненко), ООО «СТАЙЛАБ» (А.В. Галкин).

2. Утверждены и введены в действие Главным врачом ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, председателем Лабораторного совета Федеральной службы Роспотребнадзора А. И. Верещагиным 20 сентября 2006 г.

3. Введены впервые.

Содержание

Ускоренные методы выявления санитарно- показательных и патогенных микроорганизмов с использованием подложек «RIDA®COUNT», производства Chisso Corporation, Япония

1. Общие положения 4
2. Нормативные ссылки 4
3. Требования к помещениям и технике безопасности 5
4. Аппаратура и материалы 5
5. Описание и принцип действия 5
6. Сущность метода 7
7. Методы отбора проб 7
8. Подготовка проб к испытанию 7
9. Подготовка подложек серии RIDA®COUNT 7
10. Проведение испытаний для подсчета количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, лактобактерий, количества дрожжей и плесневых грибов, колиформных бактерий, бактерий вида E.coli, S. aureus 7
11. Проведение испытаний для выявления сальмонелл 8
12. Обработка результатов 9

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
Председатель Лабораторного совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
А. И. Верещагин
«20» сентября 2006 г.

Ускоренные методы выявления санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов с использованием подложек «RIDA®COUNT», производства Chisso Corporation, Япония

Методические рекомендации

№ 02.011-06

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации устанавливают ускоренные методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно- анаэробных микроорганизмов, лактобактерий, колиформных бактерий, бактерий вида E.coli, S. aureus, дрожжей и плесневых грибов, сальмонелл при проведении санитарно-бактериологических исследований.

1.2. Методические рекомендации предназначены для применения в лабораториях организаций, независимо от форм собственности, осуществляющих производственный контроль.

2. Нормативные ссылки

2.1. СП 1.2.731—99 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами.

2.2. ГОСТ 26668—85 Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов.

2.3. ГОСТ 26669—85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.

2.4. ГОСТ 26670—91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.

2.5. ГОСТ Р 51446-99 (ИСО 7218—96) Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований.

2.6. СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

2.7. СанПиН 2.3.2. 1280-03 Дополнения и изменения №2 к СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

3. Требования к помещениям и технике безопасности

Требования безопасности, общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны соответствовать требованиям СП 1.2.731, ГОСТ Р 51446.

4. Аппаратура и материалы

4.1.	Термостат с диапазоном рабочих температур 28—55 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с допустимой погрешностью ± 1°С	ТУ 64-1-1382-83
4.2.	Стерилизатор паровой медицинский	ГОСТ 19569
4.3.	Стерилизаторы медицинские паровые и воздушные	ГОСТ 27437-87
4.4.	Гомогенизатор лабораторный	
4.5.	Облучатель бактерицидный	ТУ16-535-84
4.6.	Весы лабораторные общего назначения 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104
4.7.	Холодильник бытовой электрический.	ГОСТ 16317
4.8.	Лупа измерительная	ГОСТ 25706-93
4.9.	Микроскоп световой биологический или других марок	ГОСТ 2884-78
4.10.	Пипетки градуированные исполнения 1, 2 классов точности, вместимостью 1 $см^3$, 5 $см^3$, 10 $см^3$	ГОСТ 29227
4.11.	Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672-75
4.12.	Стекла предметные для макропрепаратов	ГОСТ 6672-75
4.13.	Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90
4.14.	Пробирки бактериологические	ГОСТ 25336-82
4.15.	Прибор для мембранной фильтрации	
4.16.	RIDA®COUNT Total	
4.17.	RIDA®COUNT Lactic acid bacteria	
4.18.	RIDA®COUNT Enterobacteriaceae	
4.19.	RIDA®COUNT Coliform	
4.20.	RIDA®COUNT E. coli	
4.21.	RIDA®COUNT E. coli/ Coliform	
4.22.	RIDA®COUNT Yeast & Mould Rapid	
4.23.	RIDA®COUNT Salmonella	
4.24.	RIDA® COUNT Enterobacteriaceae/ Salmonella	
4.25.	RIDA®COUNT S. aureus	

Подложки RIDA®COUNT выпускаются на предприятии, сертифицированном в соответствии с ISO-9001.

5. Описание и принцип действия

5.1. Данный метод основан на использовании готовых стерильных сухих подложек, представляющих собой готовую систему с набором питательных веществ, герметично закрытыми непроницаемой мембраной, которая снимается перед посевом, закрывается после него и термостатируется при соответствующих температурах. Слой сухой питательной среды на подложке покрыт специальным нетканым волокном, обеспечивающим превосходное

впитывание и распределение исследуемых проб по поверхности подложки. Прозрачная пленка предохраняет подложки от загрязнения при инкубации.

5.2. Подложки RIDA®COUNT Total предназначены для выявления и подсчета количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов при культивировании в аэробных условиях. Подложки представляют собой готовую систему для нанесения исследуемого образца на питательную среду, содержащую стандартный набор питательных веществ и хромогенный субстрат. Восстановление хромогена (ТТС-красный) в точках роста бактерий приводит к окрашиванию образующихся колоний в красный цвет, что значительно облегчает подсчет колоний. При использовании в качестве разбавителя MRS-бульон и при инкубировании посевов в анаэробных условиях, возможно использование подложек для выявления и подсчета лактобактерий.

5.3. Подложки RIDA®COUNT Yeast & Mould Rapid предназначены для ускоренного выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов. Подложки представляют собой готовую систему для нанесения исследуемого образца, содержащую питательную среду (дрожжевой экстракт и глюкозу) с антибиотиком – хлорамфениколом, который ингибирует рост сопутствующей бактериальной флоры на подложке. Ферментация глюкозы, в присутствии эстеразного субстрата, приводит к изменению pH – среды, индикатор окрашивает колонии дрожжей и плесневых грибов в зелено-голубой цвет, что облегчает подсчет колоний.

5.4. Подложки RIDA®COUNT Coliform предназначены для выявления в исследуемом образце колиформных бактерий, а также их количественного определения. Подложки представляют собой готовые системы, содержащие модифицированный питательный состав с желчью ингибирующий рост грамположительных бактерий. Характерный для колиформных бактерий фермент β – галактозидаза расщепляет хромогенный субстрат, что приводит к формированию голубых колоний, колиформные бактерии с высоким метаболизмом или низкой энзимной активностью (поврежденные клетки) формируют колонии зеленого цвета.

5.5. Подложки RIDA ® COUNT E. coli предназначены для ускоренного определения бактерий вида E.coli. Подложки представляют собой готовые системы, содержащие модифицированный питательный состав ингибирующий рост грамположительных бактерий. Принцип действия основан на выявлении у E.coli. высокоспецифического фермента β-глюкуронидазы. Хромогенный субстрат Х-глюкуронид, используемый в данной среде, позволяет выявить глюкуронидазную активность. Клетки E.coli сорбируют Х-глюкуронид, внутриклеточная глюкуронидаза расщепляет связь между глюкуронидом и хромофором, который, высвобождаясь, окрашивает колонии E.coli в пурпурный цвет.

5.6. Подложки RIDA®COUNT E. coli/Coliform предназначены для ускоренного одновременного определения колиформных бактерий и бактерий вида E.coli. Подложки представляют собой готовые системы, содержащие модифицированный питательный состав с желчью и кристаллическим фиолетовым, ингибирующими рост грамположительных бактерий. Принцип действия основан на выявлении характерного для колиформных бактерий фермента β – галактозидаза, у E.coli. высокоспецифического фермента β-глюкуронидазы. Для обнаружения этих ферментов в питательный состав подложек входят хромогенные субстраты, при расщеплении которых этими ферментами образуются окрашенные продукты. В результате колонии E. coli окрашиваются в пурпурный цвет, а колиформные бактерии в светло-синий, светло-зеленый цвета.

5.7. Подложки RIDA®COUNT Salmonella предназначены для ускоренного определения бактерий рода Salmonella. Подложки представляют собой готовые системы, содержащие модифицированный XLD - агар (ксилозо-лизин-дезоксихалатный агар). Присутствие в среде дезоксихалата натрия ингибирует рост сопутствующей грамположительной флоры. Сальмонеллы ферментируют ксилозу и декарбоксилируют лизин до кадаверина, что сопровождается повышением величины pH и выделением сероводорода, который, соединяясь с железом, образует сульфид железа, что выражается в формировании черных колоний.

5.8. Подложки RIDA®COUNT S. aureus предназначены для ускоренного определения S. aureus. Подложки представляют собой готовые системы, содержащие модифицированный маннитол-фенол-солевой агар. Высокая концентрация хлорида натрия и антибиотиков ингибирует рост большинства бактерий, за исключением стафилококка. Ферментация

маннитола, связанная с кислотно-фосфатазной активностью стафилококка, приводит к понижению pH среды, колонии окрашиваются в зелено-голубой цвет.

6. Сущность метода

Метод основан на высеве определенного количества образца или его разведения на подложки RIDA®COUNT, инкубировании посевов, подсчете всех выросших видимых колоний.

7. Методы отбора проб

Отбор проб проводят по ГОСТ 26668 или в соответствии с требованиями других действующих ГОСТ и НД на конкретные виды анализируемых образцов.

8. Подготовка проб к испытанию

8.1. Подготовку проб проводят в соответствии с ГОСТ 26669 на пищевые продукты и другими действующими ГОСТ и НД на конкретные виды анализируемых образцов.

8.2. Масса (объем) навески продукта, предназначенной для приготовления исходного разведения или гомогената, должна составлять не менее 10,0 ±0,1 г/см³.

8.3. Исходные разведения продуктов с массовой долей NaCl более 5 % готовят с использованием пептонной воды, исходные разведения мясных, рыбных и молочных продуктов — с использованием физиологического раствора.

8.4. При определении лактобактерий для исходного разведения и последующих разведений навески используют MRS-бульон.

8.5. Соотношение между количеством (массой) высеваемого образца или его эквивалентным разведением и питательной средой - 1: 9 по объему.

8.6. Для приготовления разведений навески продукта используют пептонно-солевой раствор.

8.7. Жидкие образцы можно не разводить.

8.8. Твердые продукты гомогенизируют.

8.9. Для обеспечения оптимального роста микроорганизмов величина pH исследуемого образца продукта или его разведения должна быть в интервале значений 6,6—7,2. Для кислых продуктов величину pH регулируют 1н раствором NaOH. Для щелочных продуктов величину pH регулируют 1н раствором HCl.

9. Подготовка подложек серии RIDA®COUNT

9.1. Невскрытые пакеты с подложками серии RIDA®COUNT хранят в холодильнике при температуре 8 °С.

9.2. Перед использованием подложки выдерживают при комнатной температуре.

9.3. После вскрытия пакета неиспользованные подложки вкладывают в пакет из фольги и закрывают его с помощью скрепки.

9.4. Вновь запечатанные пакеты хранят при температуре 2-8°С.

10. Проведение испытаний для подсчета количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, количества дрожжей и плесневых грибов, лактобактерий, колиформных бактерий, бактерий вида E.coli, S. aureus.

10.1. Подложки серии RIDA®COUNT помещают на ровную поверхность.

10.2. Из подготовленного образца продукта или его соответствующего разведения, смывной жидкости отбирают образец объемом 1,0 см³.

10.3. Снимают прозрачную пленку подложки, в некоторых случаях пленку снимают полностью и кладут рядом. Пленку необходимо сохранить.

Вносят 1,0 см³ исследуемого образца или его разведения в центр подложки.

10.4. Опускают верхнюю пленку на образец, не допуская образования пузырьков воздуха. Прижимают пленку по периметру подложки, избегая контакта с её центральной частью.

10.5. Возможно использование подложек при прямом исследовании загрязнения поверхностей, оборудования, упаковки, рук персонала и др. предметов. Для этого с помощью пипетки на открытую подложку вносят 1,0 см³ стерильного физиологического раствора, затем подложку закрывают пленкой. После 10-15 минут равномерного распределения раствора по подложке пленку снимают и влажную подложку прижимают к исследуемой поверхности. Затем подложку закрывают пленкой в соответствии с рекомендациями п. 10.4. При исследовании поверхностей можно также использовать сухие подложки, на которые потом наносят 1,0 см³ стерильного физиологического раствора. Промежуток времени между отбором пробы на сухую подложку и внесением на неё стерильного физиологического раствора может составлять до 24ч.

10.6. При исследовании поверхностей с помощью тампонов предварительно на открытую подложку вносят 1,0 см³ стерильного физиологического раствора и закрывают подложку пленкой. Равномерное распределение раствора по подложке проводится в течение 10-15 минут. В это время, исследуемую поверхность протирают стерильным латексным или хлопковым тампоном, затем снимают пленку и с помощью тампона проводят посев по всей поверхности подложки.

10.7. При использовании метода мембранной фильтрации образец пропускается через мембранный фильтр, затем, извлеченный из фильтродержателя мембранный фильтр, помещают на подложку тыльной стороной вверх. Предварительно на подложку вносят 1,0см³ стерильного физиологического раствора и оставляют на 10-15 минут для впитывания.

10.8. В термостате подложки располагают в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх. Допускается размещать подложки друг на друга.

10.9. *Подложки серии* RIDA®COUNT *инкубируют:*

10.9.1. При определении и подсчете количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в течение 24 -48ч при температуре 37 °С.

10.9.2. При определении и подсчете лактобактерий в течение 48ч при температуре 37 °С в анаэробных условиях.

10.9.3. При определении и подсчете количества дрожжей и плесневых грибов в течение 48-120ч при температуре 25 °С.

10.9.4. При определении и подсчете количества колиформных бактерий и бактерий рода E.coli. в течение 24ч при температуре 37 °С.

10.9.3. При определении и подсчете количества S. aureus в течение 24 -48ч при температуре 37 °С.

11. Проведение испытаний для выявления сальмонелл

11.1. Для выявления сальмонелл проводят предварительное обогащение образца по ГОСТ 30519.

11.2.*Неселективное обогащение образца.*

11.2.1. Навеску анализируемого образца массой 25,0 г или 25,0 см³ вносят в 225 см³ забуференной пептонной воды.

11.2.2. Твердые образцы измельчают в гомогенизаторе.

11.2.3. Посевы инкубируют в течение 18-20ч при температуре 37 °С.

11.3. Селективное обогащение.

11.3.1. Культуры, полученные после инкубирования по п.11.2.3., пересевают в две среды для селективного обогащения. Для этого по10,0 см³ культуры переносят в магниевую среду или Раппапорт -Василиадис и в тетратионатную среду, в соотношении 1: 9.

11.3.2. Посевы инкубируют с магниевой средой или Раппапорт –Василиадис в течение 24ч при температуре 37°С, с тетратионатной средой в течение 24ч при температуре 43±1 °С.

11.4. Подложки RIDA®COUNT Salmonella или RIDA®COUNT Enterobacteriaceae/ Salmonella помещают на ровную поверхность.

11.5. Из каждой среды обогащения отбирают образец объемом 1,0 см³.

11.6. Снимают прозрачную пленку подложки, в некоторых случаях пленку снимают полностью и кладут рядом. Пленку необходимо сохранить.

Вносят 1,0 см³ исследуемого образца в центр подложки.

11.7. Опускают верхнюю пленку на образец, не допуская образования пузырьков воздуха. Прижимают пленку по периметру подложки, избегая контакта с её центральной частью.

11.8. Подложки RIDA® COUNT Salmonella или RIDA® COUNT Enterobacteriaceae/ Salmonella инкубируют в течение 24ч при температуре 37 °С.

11.9. Колонии можно изолировать для дальнейшей идентификации по ГОСТ 30519. Для этого необходимо поднять верхнюю пленку, затем пористую салфетку и извлечь колонию из геля.

12. Обработка результатов

12.1. После инкубирования подложек RIDA®COUNT Total подсчитывают все красные колонии, независимо от их размера и интенсивности окраски.

12.1.1. Если инкубированные подложки с разведением образца 1: 10 не содержат колоний, то результат выражают следующим образом: меньше, чем 1×10^1 или 10 бактерий на 1,0 см³ (г) продукта.

12.1.2. Если на подложках с разведением образца 1: 10 содержится меньше, чем 30 колоний, то результат выражают так: количество микроорганизмов менее М × 10, где М – число выросших колоний.

12.1.3. Если количество колоний более 30, подсчитывают количество колоний и умножают на соответствующее разведение и получают число микроорганизмов в 1,0 см³ (г) продукта.

12.1.4. На пластинах, где выросло более 300 колоний, подсчитывают количество колоний в одном или более показательных квадратах и определяют среднее количество колоний на квадрат. Умножают среднее число колоний на 20, так как зона роста подложек имеет площадь 20 $см^2$ и на соответствующее разведение, получают число микроорганизмов в 1,0 $см^3$ (г) продукта.

12.1.5.Полученный результат округляют по ГОСТ 26670.

12.1.6. Ответ выражают в виде числа КОЕ/г ($см^3$).

12.2. После инкубирования подложек RIDA®COUNT Yeast & Mould Rapid в течении 48 ч подсчитывают количество дрожжей и плесневых грибов суммарно.

12.2.1. Через 48 часов инкубации на подложке учитывают колонии дрожжей и плесневых грибов сине-зеленого цвета.

12.2.2. При необходимости для разделения колоний дрожжей и плесневых грибов увеличивают время инкубации, проводят микроскопические исследования. После 120 часов инкубации колонии дрожжей на подложках сине-зеленые или белые с сине-зеленым ореолом, растекающиеся круглые, более светлые. Колонии плесневых грибов опушенные, более диффузные, чем колонии дрожжей, большего размера, более темные по цвету. Для выполнения микроскопического исследования поднимают верхнюю пленку подложки, затем пористую салфетку и вынимают колонию из геля. Из колонии готовят препарат методом раздавленной капли. На предметное стекло наносят каплю стерильной водопроводной воды. Затем в эту каплю вносят часть колонии. Полученная суспензия покрывается покровным стеклом.

12.2.3. Результаты микроскопирования оценивают, пользуясь характеристикой дрожжей и плесневых грибов.

12.2.4.Для количественного подсчета отбирают пластины, на которых выросло от 15 до 150 колоний дрожжей и от 5 до 50 колоний плесневых грибов, умножают на соответствующее разведение и получают число дрожжей или плесневых грибов в 1,0 см³ (г) продукта.

12.2.5. На пластинах, где выросло более 150 колоний дрожжей и более 50 колоний плесневых грибов, подсчитывают количество колоний в одном или более показательных квадратах и определяют среднее количество колоний на квадрат. Умножают среднее число колоний на 20, так как зона роста подложек имеет площадь 20 $см^2$ и на соответствующее разведение, получают число микроорганизмов в 1,0 $см^3$ (г) продукта.

12.2.6. Результаты обрабатывают и пересчитывают отдельно для дрожжей и плесневых грибов.

12.3. После инкубирования подложек RIDA®COUNT Coliform, RIDA®COUNT E. coli, RIDA®COUNT E. coli/ Coliform учитывают колиформные бактерии и E. coli, окрашенные в определенный цвет в соответствии с применяемым хромогенным субстратом.

12.3.1. При необходимости колонии можно изолировать для дальнейшей идентификации

12.4. После инкубирования подложек RIDA®COUNT S. aureus, учитывают зелено-голубые колонии диаметром 1мм как S. aureus, колонии более бледного цвета или другого цвета, диаметром менее 1мм не учитывают.

12.4.1. При необходимости колонии можно изолировать для дальнейшей идентификации.

12.5. После инкубирования подложек RIDA®COUNT Salmonella, круглые, резко очерченные колонии черного цвета учитывают как сальмонеллы. Колонии тусклые, черного или коричневого цвета, расплывчатые, мигрирующие, относят к протею, колонии почти не окрашенные, большого размера относят к цитробактеру.

12.5.1. При необходимости колонии можно изолировать для дальнейшей идентификации.

gost.e-ecolog.ru